

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/04117 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Februar 1997 (06.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01253 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Juli 1996 (08.07.96) (30) Prioritätsdaten: 195 25 900.9 15. Juli 1995 (15.07.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SANDIG, Volker [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 1, D-13125 Berlin (DE). LÖSER, Peter [DE/DE]; Eichbuschallee 41a, D-12437 Berlin (DE). STRAUSS, Michael [DE/DE]; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: LIVER-SPECIFIC ADENOVIRUS EXPRESSION VECTOR (54) Bezeichnung: LEBERSPEZIFISCHER ADENOVIRUS-EXPRESSIONSVEKTOR (57) Abstract The invention concerns an adenovirus vector for liver-specific gene therapy. Areas of application include, in medicine, the treatment of genetic defects and tumour diseases of the liver, and molecular biology. The vector according to the invention is characterized in that a therapeutic gene which is coupled to a liver-specific promoter consisting of enhancer elements of the hepatitis B virus and an enhancer-less minimal promoter and is optionally surrounded by SAR elements is inserted in the adenovirus genome. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft einen Adenovirusvektor für die leberspezifische Gentherapie; Anwendungsgebiete sind in der Medizin die Behandlung von Gendefekten und Tumorerkrankungen der Leber und die Molekularbiologie. Der erfindungsgemäße Vektor ist dadurch gekennzeichnet, daß ein therapeutisches Gen, das an einen leberspezifischen Promotor gekoppelt ist, welcher aus Enhancer-Elementen des Hepatitis B Virus und einem enhancerlosen Minimalpromotor besteht und ggf. von SAR-Elementen umgeben ist, in das Adenovirusgenom inseriert wird.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Leberspezifischer Adenovirus-Expressionsvektor

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Adenovirusvektor für die leberspezifische Gentherapie; Anwendungsgebiete sind in der Medizin die Behandlung von Gendefekten und Tumorerkrankungen der Leber und die Molekularbiologie.

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Methoden und Vektoren für die Gentherapie entwickelt worden (Übersicht in Mulligan/1993/Science 260, 920). Von Viren abgeleitete Vektoren werden dabei nichtviralen Transferverfahren gegenübergestellt, bei denen das therapeutische Gen in Protein- bzw. Lipidhüllen eingebettet ist. Die Kopplung dieser Partikel an Liganden spezifischer Rezeptoren ermöglicht die bevorzugte Aufnahme durch Zellen, die diese Rezeptoren tragen. Dies ist für den gentherapeutischen Ansatz *in vivo* von Vorteil - trotz systemischer Gabe gelangt das therapeutische Gen nur in Gewebe, in denen dessen Aktivität gewünscht wird.

Dennoch werden gegenwärtig virale Vektoren, vor allem die Virusgruppen Retrovirus und Adenovirus, aufgrund ihrer größeren Effektivität *in vivo* bevorzugt. Beide Viren erlauben den Gentransfer in Leberzellen. Die retrovirale Infektion führt zu einer stabilen Integration des genetischen Materials in das zelluläre Genom. Dieser Prozess ist auf Zellproliferation angewiesen - ein für Leberzellen *in vivo* seltenes Ereignis. Während Hepatozyten in Kultur effektiv infiziert werden, erfordert der Einsatz von Retroviren in der Leber deshalb einen Proliferationsstimulus durch Leber-teilresektion (Ferry et al./1991/ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8377) oder Verfahren, die zu einem akuten Absterben eines großen Teils der Hepatozyten führen (Lieber et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press).

Adenoviren sind allen anderen Vektortypen in ihrer

Effektivität weit überlegen. Nahezu 100% der Hepatozyten können selbst bei intravenöser Gabe vom Virus erreicht werden. Adenoviren liegen in der Zelle als Episom vor.

Im Gegensatz zu Retrovirus-Vektoren enthalten adenovirale Vektoren den größten Teil des viralen Genoms. Bei den ursprünglich verwendeten Vektoren wurde lediglich die E1 Region in die zur Virusvermehrung genutzte Helferzelle (HEK293) ausgelagert und damit eine Replikation des Virus im Zielgewebe verhindert. Weil die Adenovirushülle maximal 105% der Genomgröße (40kb) aufnehmen kann, war die E1-Deletion auch für die Insertion neuer Gene essentiell. Zur Erweiterung des Aufnahmevermögens auf maximal 8,3kb wurden zusätzlich Teile der E3-Region deletiert (Bett et al./1994/ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8802). Obwohl die wesentlichsten Transaktivatoren adenoviraler Gene, Produkte der E1 Region, in der Zielzelle fehlen, werden zusätzlich zum therapeutischen Gen auch virale Gene exprimiert. Die Exposition der entsprechenden Proteine auf der Zelloberfläche führt zur Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen und zur Elimination der infizierten Zellen. Durch funktionelles Ausschalten weiterer Transaktivatoren z.B. E2A konnte dieser Effekt wesentlich reduziert werden (Yang et al./1994/Nature Genetics 7, 362).

Ein wesentlicher Nachteil existierender Adenovirusvektoren besteht in der fehlenden Gewebespezifität. Adenovirus-rezeptoren sind auf einer Vielzahl von Zelltypen vorhanden. Die zusätzliche Kopplung von Liganden spezifischer Rezeptoren an das Virus erscheint deshalb wenig aussichtsreich.

Leberspezifität ist außer durch den Aufnahmemodus auch durch Verwendung leberspezifischer Promotoren möglich. Verschiedene in Hepatozyten aktive zelluläre Promotoren (Albumin- und α 1-Antitrypsin-Promotor) wurden auf ihre Eignung für die Gentherapie in Retroviren untersucht (Rettinger et al./1994/ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1460). Aufgrund ihrer Größe

sind sie jedoch für die Verwendung in Adenovirus-Vektoren ungeeignet. Die im adenoviralen Kontext häufig verwendeten starken viralen Promotoren (CMV- und RSV-Promotor) sind ubiquitär aktiv und werden in der Leber nach kurzer Zeit abgeschaltet.

Ziel der Erfindung ist die Konstruktion eines Vektors auf der Basis von Adenovirus, der die Vorzüge eines Adenovirus-Vektors mit der Eigenschaft einer leberspezifischen Expression von therapeutischen Genen verbindet.

Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Wesentlicher Bestandteil der Erfindung ist ein kurzer hochaktiver und leberspezifischer Promotor, an welchen das therapeutische Gen gekoppelt wird. Er besteht aus Enhancer-Elementen des Hepatitis B Virus und einem enhancerlosen Minimalpromotor und ist gegebenenfalls von SAR-Elementen (scaffold attached regions) umgeben. Das geschieht, um den Einfluß von adenoviralen Enhancern in der Umgebung des inserierten Gens abzuschirmen. Als ein solches Element wird bevorzugt die SAR-Region des humanen Interferon- β -Gens eingesetzt.

Als Enhancer-Element des Hepatitis B Virus wird bevorzugt der Enhancer II verwendet, er ist durch die Positionen 1628-1807 des viralen Gens bestimmt und auf den Subtyp ayw bezogen.

Als enhancerloser Minimalpromotor wird bevorzugt ein Teil des frühen Promotors des Cytomegalievirus eingesetzt. Er ist durch die Positionen -55 bis +69 hinsichtlich des Transkriptionsstarts gekennzeichnet. Wesentliche Elemente des Minimalpromotors sind die TATA-Box, der "cap-Ort" und die 5'-nichttranslatierte Region. Der Minimalpromotor hat eine niedrige Basisexpression und ist durch den Hepatitis B Virus Enhancer II aktivierbar.

Der bevorzugte Ort für die Insertion der erfindungsgemäßen, aus Enhancer, Promotor und Gen bestehenden Expressionseinheit ist die El-Region des Adenogenoms. Als Adenoviren werden vor allem die Subtypen 2 und 5 dieses Virus eingesetzt.

Als therapeutisches Gen wird die cDNA des humanen LDL-Rezeptors verwendet. Dieses Gen ist bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie mutiert. Der Rezeptor ist besonders stark auf Hepatocyten vertreten; die Therapie erfordert eine dauerhafte hohe Expression in diesen Zellen.

Die Stelle der cDNA des LDL-Rezeptors können die cDNAs anderer Gene einnehmen, wenn diese bei der zu jeweils behandelnden Krankheit defekt und hauptsächlich in der Leber aktiv sind.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Vektors bestehen in der Verbindung einer hohen Effizienz der Infektion mit hoher Spezifität der Expression für Leberzellen. Darüber hinaus bleibt der Promotor in der Leber über lange Zeit aktiv, wenn er in Adenovirus-Vektoren mit reduzierter Immunogenität verwendet wird. Dies ermöglicht seinen Einsatz zu einer effektiveren Therapie angeborener Gendefekte der Leber.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

In vivo-Strategien der Lebergentherapie erfordern hepatozytenspezifische Vektoren.

Adenoviren sind für einen *in vivo*-Genetransfer aufgrund hoher Titer und Stabilität im Blut besonders geeignet. Die natürlichen Zielzellen für Adenoviren sind die Zellen epitelialer Gewebe. Ein besonderer Tropismus für Hepatozyten besteht nicht. Die Organspezifität muß also durch spezielle Applikationswege oder Veränderungen am Virus selbst

herbeigeführt werden.

Aufgrund der Komplexität der Virushülle und der noch ungeklärten Virus-Rezeptor-Interaktion erscheint eine Modifikation von Virusproteinen für die selektive Infektion von Hepatozyten wenig aussichtsreich. Alternativ kann jedoch die Expression des transferierten therapeutischen Gens durch die Verwendung leberspezifischer Promotoren auf Hepatozyten beschränkt werden.

Zelluläre Promotoren mit bekannter Leberspezifität (Albuminpromotor, Alpha1-Antitrypsinpromotor) sind aufgrund ihrer Größe nicht für eine Verwendung in adenoviralen Vektoren geeignet bzw. scheiden aufgrund strenger metabolischer Kontrolle (PEPCK-Promotor) aus.

Das Hepatitis B-Virus besitzt ein Genom von 3,2 kb, dessen Gene von 4 verschiedenen Promotoren (preS1-, S-, core- und X-Promotor) gesteuert werden. Sie werden von 2 Enhancern (Enhancer I und II) in unterschiedlichem Maße zusätzlich aktiviert. Alle diese Kontrollelemente umfassen nur wenige hundert Basenpaare.

Diese Promotoren/Enhancer wurden durch PCR aus dem klonierten Genom des Hepatitis B-Virus (Subtyp ayw) gewonnen und vor ein promotorloses Luziferasegen kloniert. Im transienten Expressionstest (Bestimmung der Luciferaseaktivität) in den Leberzelllinien HuH7 und HepG2 und HepSV40 sowie den Nichtleberzelllinien NIH3T3, HeLa und CV1 wurden die Promotoren auf ihre Leberspezifität hin untersucht und zusätzlich die Promotorstärke mit der des CMV-Promotors verglichen. Die Transfektion erfolgte mittels der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitationstechnik und wurde durch Kopräzipitation eines RSV-Promotor-gesteuerten β -Galaktosidasegens und Messung von β -Galaktosidaseaktivität standardisiert. (Abb.1)

Mit Hilfe dieser Expressionsstudien wurde der core-Promotor/Enhancer II (pCPluc, nt1628-1807) als Promotor mit deutlicher Präferenz für Hepatozyten bei moderater Promotorstärke ausgewählt.

Es wurde angenommen, daß die Leberspezifität der Expression

hauptsächlich durch den Enhancer II vermittelt wird. Um einen leberspezifischen Promotor mit höherer Aktivität zu erzeugen, wurde der Enhancer II mit einem gut aktivierbaren enhancerlosen Minimalpromotor gekoppelt. Als solcher Minimalpromotor wurden TATA-Box und Transkriptionstart-Region (nt-55-+69) des Promotors der frühen Cytomegalievirus-transkripte verwendet. Der geschaffene künstliche Promotor (EIImCMV) erreicht in Hepatozyten mehr als 25% der CMV-Promotoraktivität und ist damit als starker Promotor einzustufen. Die Selektivität für Hepatozyten ist weitgehend erhalten. Der Promotor ist auch in primären Hepatozyten von Maus, Schwein und Mensch hochaktiv.

Entscheidend für eine Verwendbarkeit in Gentherapie-Vektoren ist die Langzeitaktivität in Hepatozyten. Für einen diesbezüglichen Test wurden die Promotoren mit dem β -Galaktosidasegen fusioniert und in den episomalen Expressionsvektor pREP8 (Invitrogen) kloniert. Es wurden stabile Hepatozytenlinien (HuH7) mit dem Episom erzeugt und die β -Galaktosidaseexpression über 3 Monate verfolgt. In diesem Zeitraum war kein Absinken der Expression feststellbar.

Die Promotoren CP und EIImCMV sowie der CMV-Promotor wurden im folgenden mit der cDNA des humanen LDL-Rezeptors gekoppelt.

Der Rezeptor wird hauptsächlich in der Leber exprimiert. Die Erbkrankheit "Familiäre Hypercholesterinämie" beruht auf einem Defekt in diesem Gen und ist durch den gezielten Transfer eines aktiven LDL-Rezeptorgens in die Leber therapierbar.

Die Expressionseinheit aus dem jeweiligen Promotor und der LDL-Rezeptor-cDNA wurde in das Adenovirus-Transfer-Plasmid pdE1splA in beiden möglichen Orientierungen inseriert. Durch Kotransfektion mit dem Adenovirusgenom (pJM17) in die Helferzelllinie HEK293 wurden rekombinante Adenoviren erzeugt.

Viren aus individuellen Rekombinationsereignissen wurden durch Plaque-Assay isoliert, in HEK293-Zellen vermehrt, durch zweifache Sedimentation im CsCl_2 -Gradienten aus dem Zellysatz gereinigt und der Titer der Virusstocks bestimmt.

Testung der Promotoraktivität und Spezifität nach adenoviralem Gentransfer in vitro

Die Leberzelllinien HepG2 und HuH7 sowie die Nichtleberzelllinien HeLa und CV1 wurden mit 50 Viren/Zelle infiziert und die Expression des LDL-Rezeptorgens drei Tage nach Infektion auf RNA-Niveau durch RNase-Schutz sowie auf Protein-Niveau im Western-Blot nachgewiesen.

Während die Aktivität des CMV-Promotor-gesteuerten Gens in allen untersuchten Zelllinien eine ähnliche Höhe erreichte, war eine hohe Expression von CP und EII_{CMV}-Promotoren nur in Hepatozytenzelllinien zu finden (Abb.3). Die Orientierung der Expressionseinheit im Virus hatte nur geringfügigen Einfluß auf die Expressionshöhe. Die Aktivität des HBV/CMV-Hybridpromotors erreichte etwa 30% der Aktivität des CMV Promotors.

Testung der Promotoraktivität und Spezifität in vivo

Um die Aktivität der Promotoren in vivo zu testen, wurden jeweils 2×10^9 Adenoviren (Ad5-CMVLDLR, Ad5-E2_{CMV}LDLR oder der Kontrollvektor Ad5-RSVbg) in die Schwanzvene von Mäusen (Auszuchtstamm NMRI) appliziert. 4 Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet und Leber, Lunge, Diaphragma und Niere entnommen. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert und zur Gewinnung von RNA und DNA genutzt. Im Southern-Blot wurde nachgewiesen, daß ein wesentlicher Teil der Viren die Leber infiziert hat. In den anderen Organen wurde nur wenig virale DNA detektiert. Da es aber Aufgabe war, auch geringe Promotoraktivität außerhalb der Leber sicher nachzuweisen, wurde in einer weiteren Gruppe von Mäusen die Lunge durch intranasale Applikation infiziert und

in einer 3. Gruppe Virus in den Quadriceps-Muskel injiziert. Tiere, bei denen im Southern-Blot vergleichbare hohe Mengen viraler DNA im jeweils infizierten Organ nachweisbar waren, wurden im "RNase protection assay" auf Transkripte des humanen LDL-Rezeptors untersucht. Während die Expression vom CMV-Promotor in allen drei Geweben vorhanden war, konnte eine Expression vom E2mCMV Promotor nur in der Leber, nicht aber in Muskel und Lunge nachgewiesen werden. Qualität und Quantität der isolierten RNA wurden durch "RNase protection assay" für das ubiquitär aktive GAPDH-Gen verifiziert. Da auch der CMV-Promotor nur geringe Aktivität in Lunge und Muskel aufwies, wurde ein hochsensitiver Assay für kompetitive RT-PCR aufgebaut. Dabei werden gleiche Mengen von RNA aus dem jeweiligen Organ mit steigenden Mengen einer verkürzten, in vitro synthetisierten LDL-Rezeptor-RNA (Kompetitor) gemischt, revers transkribiert und in einer PCR ein LDL-Rezeptorfragment amplifiziert. Mit steigender Menge an Kompetitor-RNA nimmt die Stärke des kürzeren PCR-Produkts zu, während die Menge des längeren, zellulärer RNA entsprechenden PCR-Produkts abnimmt. Die Menge an Kompetitor, bei der die Intensität beider Banden m Agarosegel identisch ist, gibt Auskunft über den Gehalt an LDL Rezeptor-RNA im Gewebe.

Die Ergebnisse kompetitiven RT-PCR bestätigten die des "RNase protection assay". Die Aktivität des E2mCMV-Promotors übersteigt die des CMV-Promotors in der Leber. Sie bleibt aber in Muskel und Lunge um den Faktor 10-30 hinter der des CMV-Promotors zurück.

Es wurden also Adenovirusvektoren konstruiert, die eine hohe Expression des LDL-Rezeptors spezifisch in der Leber selbst bei systemischer Gabe des Virus zulassen. Negative Effekte einer Expression in Zellen außerhalb der Leber werden dadurch ausgeschlossen.

Legende zu den Abbildungen

Abb.1

Expression des Luciferase-Reportergens, gesteuert durch verschiedene Promotoren in Hepatozytenzelllinien und Zelllinien anderen Ursprungs, gemessen als Aktivität des Luciferase-Enzyms.

Die Aktivität ist angegeben als % der mit dem CMV Promotor erreichten Aktivität. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 4 unabhängigen Transfektionsexperimenten.

Abb.2

Konstruktion von Adenoviren, die das Gen des humanen LDL-Rezeptors unter Kontrolle des CMV- bzw. HBV-abgeleiteter Promotoren exprimieren.

CMV, CMV immediate early Promotor; CP, HBV core Promotor; EI, HBV Enhancer I; EII, HBV Enhancer II ; mCMV, minimaler CMV Promotor; polyA; Polyadenylationssignal des bovinen Wachstumshormons.

Abb.3

LDL-Rezeptorexpression in Zelllinien nach adenoviralem Gentransfer

Abb.4

Expression des human LDL Receptor Gens in vivo.

Proben des jeweiligen Gewebes wurden pulverisiert und gleichermaßen zur Isolation von RNA und genomischer DNA genutzt. Jeweils 10µg Gesamt-RNA wurden im RNA-protection assay eingesetzt. Eine Antisens-RNA des LDL-Rezeptorgens bzw. des GAPDH-Gens, die unter Verwendung ³²P-markierter Nukleotide mittels T7 RNA-Polymerase in vitro synthetisiert wurde, dient dabei als Probe. Sie wird auf einer Länge von 304bp (LDLR)

bzw 316bp (GAPDH) vom jeweiligen zellulären Transkript vor RNase-Verdau geschützt.

Zur Analyse der Infektionseffektivität wurde genomische DNA im Southernblot analysiert. 10 µg genomischer DNA wurden mit NcoI verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Im 5' Bereich des Adenovirus wird dabei ein 1584bp langes Fragment frei, das durch Hybridisierung mit einer ³²P-markierten DNA-Sonde (gleiches Fragment) nachgewiesen wird.

Abb.5

Expression des human LDL Receptor Gens in vivo nachgewiesen durch RT-PCR

a) Schematische Darstellung des Prinzips der kompetitiven RT-PCR. Bei Amplifikation einer revers transkribierten LDLR-RNA aus dem Gewebe entsteht ein 450bp langes Fragment. Aus der in vitro synthetisierten verkürzten LDLR-RNA wird nach reverser Transkription ein 267bp langes Fragment amplifiziert.

b,c,d) Gleiche Mengen von RNA aus dem jeweiligen Gewebe wurden mit steigenden Mengen des verkürzten Transkripts gemischt, revers transkribiert und einer PCR mit ³²P-markierten Nukleotiden über 30 Zyklen unterzogen. Die PCR-Produkte wurden nach Auftrennung im Agarosegel am Phosphoimmager (Fuji) analysiert.

Die Dreiecke geben das Mischungsverhältnis an, bei dem die PCR-Produkte in equivalenten Mengen vorliegen.

Patentansprüche

1. Leberspezifischer Adenovirus-Expressionsvektor, gekennzeichnet dadurch, daß ein therapeutisches Gen, das an einen leberspezifischen Promotor gekoppelt ist, welcher aus Enhancer-Elementen des Hepatitis B Virus und einem enhancerlosen Minimalpromotor besteht und ggf. von SAR-Elementen umgeben ist, in das Adenovirusgenom inseriert wird.
2. Vektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß als therapeutisches Gen die cDNA eines Gens verwendet wird, das bei der zu behandelnden Krankheit defekt ist.
3. Vektor nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß als therapeutisches Gen die cDNA des humanen LDL-Rezeptors verwendet wird.
4. Vektor nach Anspruch 1-3, gekennzeichnet dadurch, daß als Enhancer-Element der Enhancer II des Hepatitis B Virus verwendet wird (Position 1628-1807 des viralen Gens, Subtyp ayw).
5. Vektor nach Anspruch 1-4, gekennzeichnet dadurch, daß als enhancerloser Minimalpromotor ein Teil des frühen Promotors des Cytomegalievirus verwendet wird.
6. Vektor nach Anspruch 1-5, gekennzeichnet dadurch, daß als enhancerloser Minimalpromotor ein Teil des frühen Promotors des Cytomegalievirus, Position -55 bis Position + 69 hinsichtlich des Transkriptionsstarts, die TATA-Box, den "cap-Ort" und die 5'-nichttranslatierte Region enthaltend, verwendet wird.

7. Vektor nach Anspruch 1-6, gekennzeichnet dadurch, daß die Expressionseinheit aus Enhancer, Promotor und Gen in die E1-Region des Adenogenoms inseriert wird.

8. Vektor nach Anspruch 1-7, gekennzeichnet dadurch, daß die Insertion in die E1-Region des Genoms von Adenovirus 2 bzw. 5 erfolgt.

cell type/ plasmid	HepG2	HuH7	HepSV40	NIH 3T3	HeLa	CV-1
pCMVluc	100	100	100	100	100	100
pSV2luc	12.9 (1.4)	9.6 (1.8)	n.d.	12.5 (2.7)	8.1 (0.5)	n.d.
pCPluc	5.4 (1.7)	4.7 (0.2)	1.5 (0.4)	0.2 (0.03)	0.2 (0.01)	0.3 (0.04)
pSCPluc	4.2 (0.9)	5.1 (0.6)	0.8 (0.2)	0.2 (0.02)	0.6 (0.1)	n.d.
pECPluc	15.7 (3.7)	10.2 (1.6)	9.4 (1.0)	0.7 (0.08)	0.7 (0.2)	0.9 (0.2)
pXPluc	5.7 (1.2)	1.2 (0.2)	22.4 (5.6)	2.8 (0.4)	n.d.	5.9 (0.4)
pSPluc	1.1 (0.4)	2.1 (0.3)	1.3 (0.1)	0.04 (0.01)	0.01 (0.003)	n.d.

Abb. 1

2/5

Abb.2 Konstruktion von rekombinanten Adenoviren



Abb. 2

3/5

Abb.3 LDL-Rezeptorexpression in Zelllinien
nach adenoviralem Gentransfer

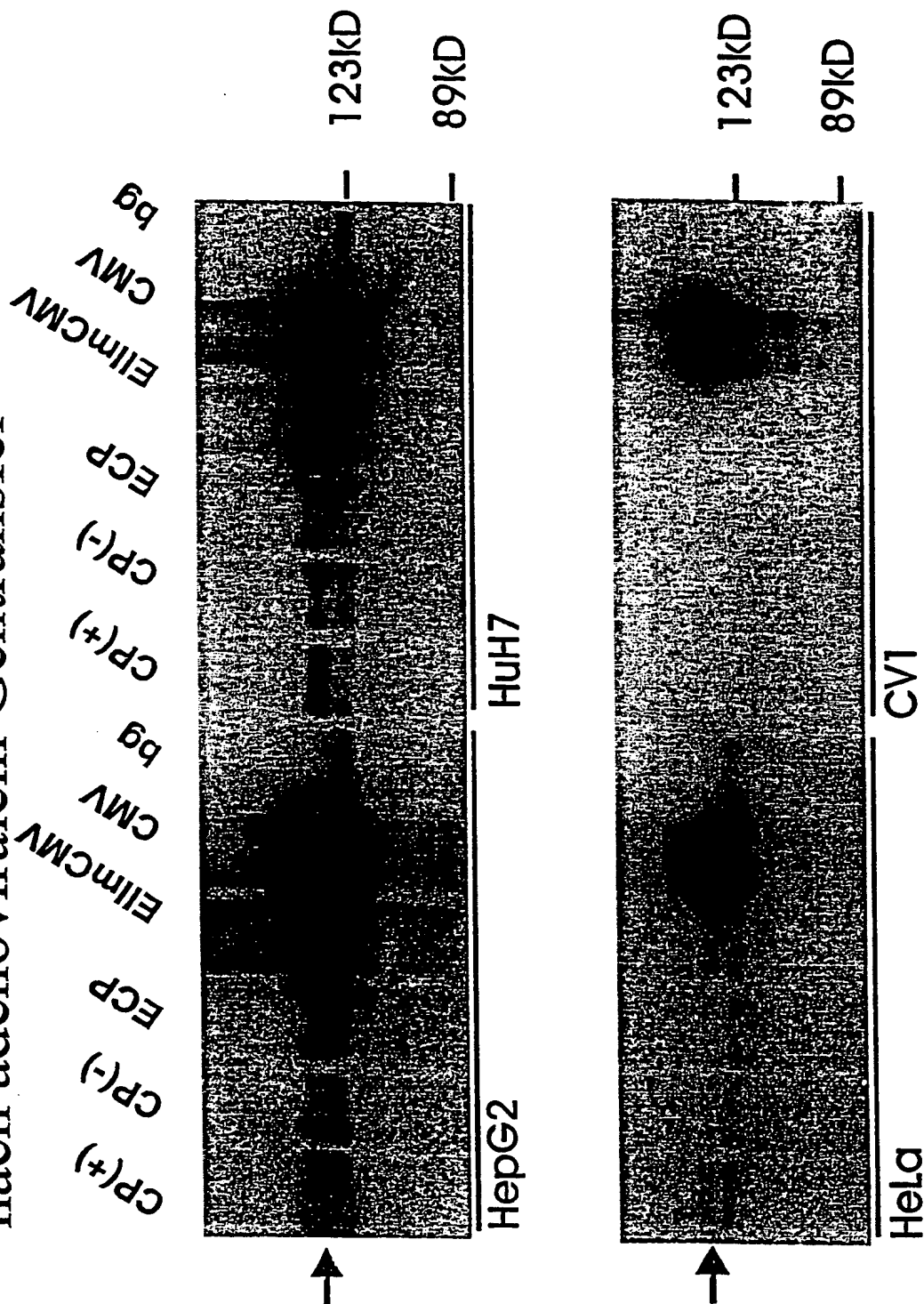


Abb. 3

Abb.4 Expression des humanen LDL-Rezeptor-Gens *in vivo* "RNAse protection assay" und Southern-Blot

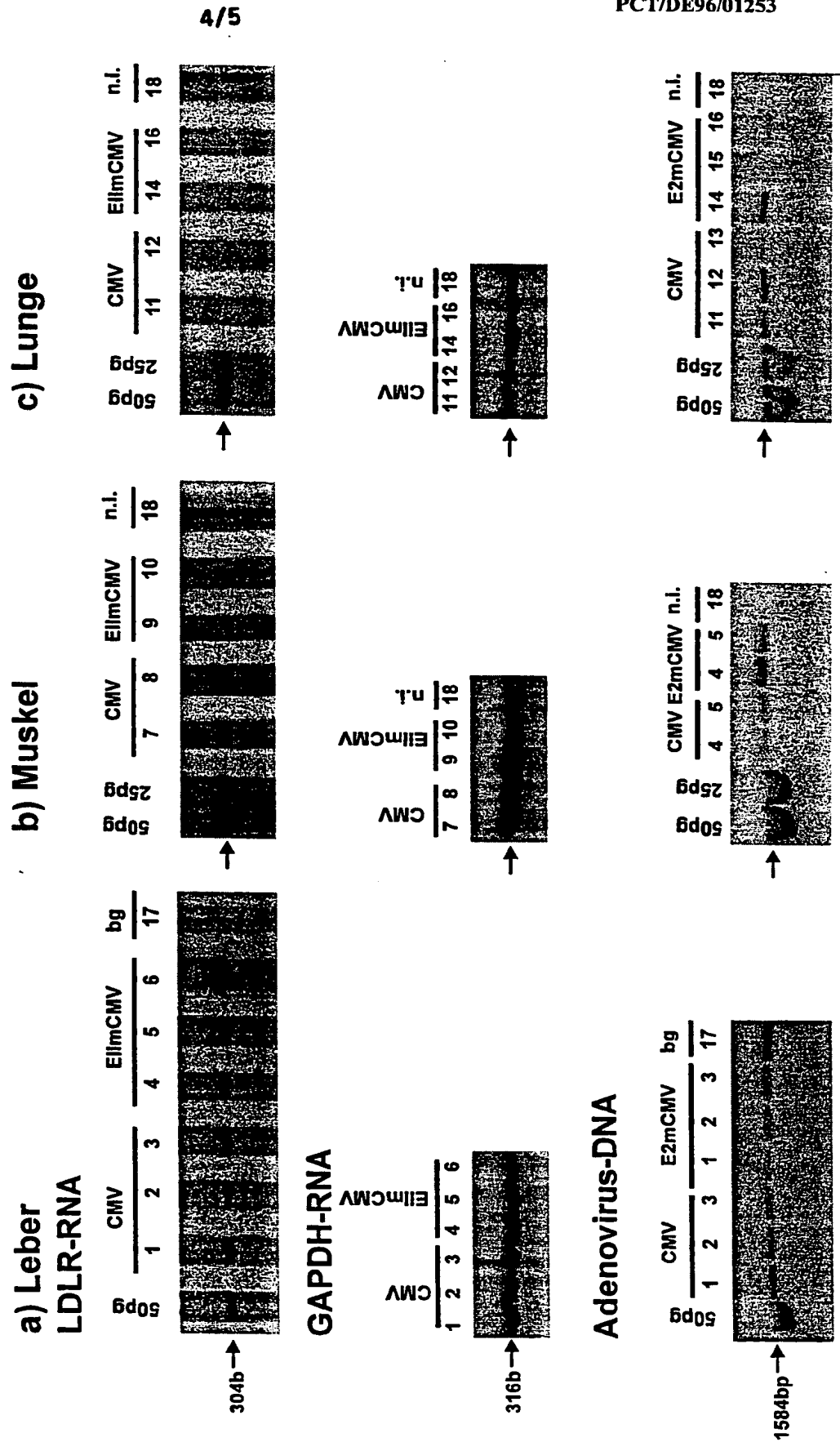


Abb. 4

Abb.5 Expression des humanen LDL-Rezeptor-Gens in vivo kompetitive RT-PCR

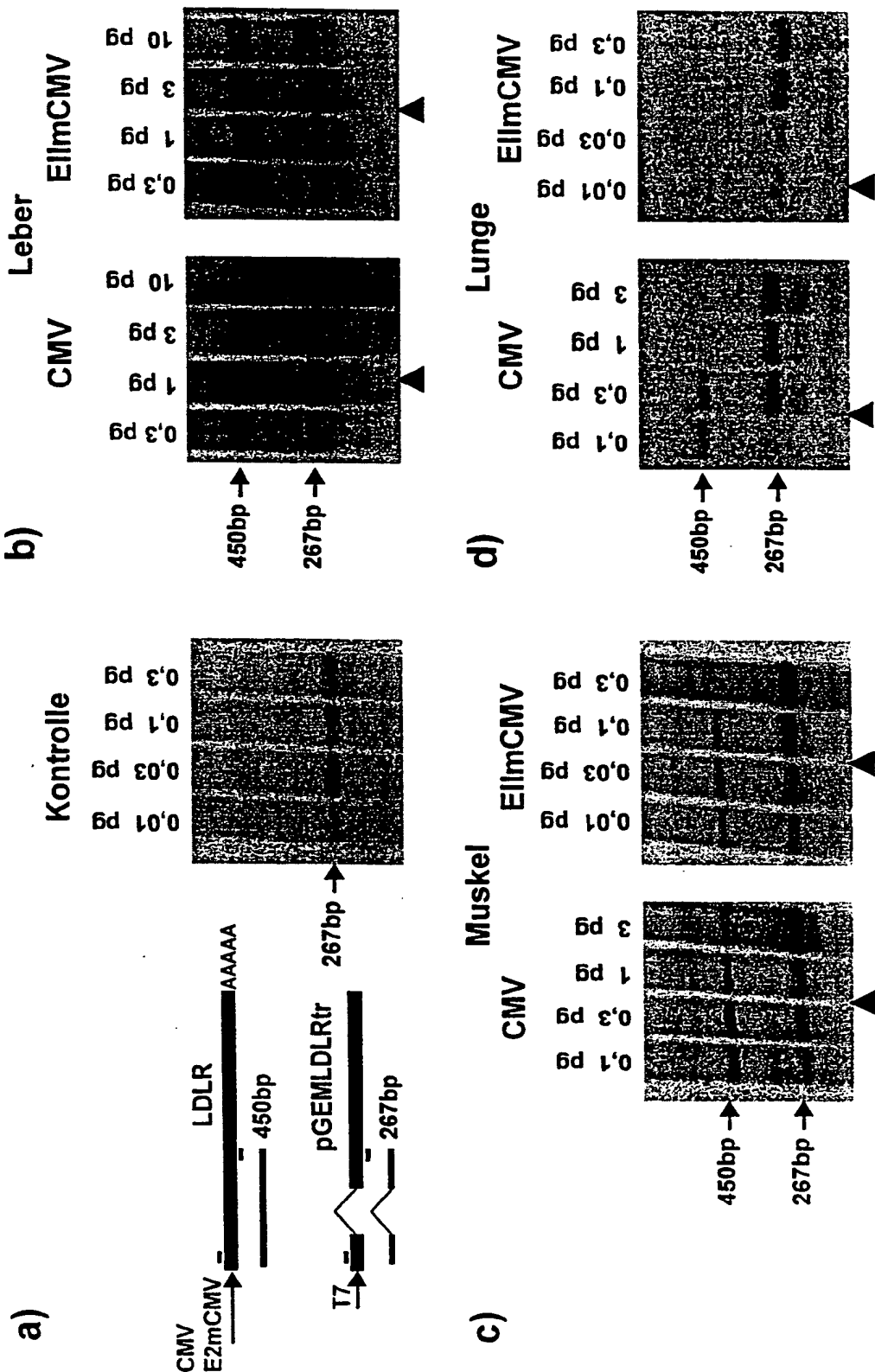


Abb. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/01253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE,C,43 39 922 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 6 October 1994 see column 1, line 43 - column 2, line 3 ---	1-8
A	WO,A,94 10322 (UNIV TEXAS ;HERZ JOACHIM (US); GERARD ROBERT D (US)) 11 May 1994 see page 5, line 34 - page 7, line 28; example 1 ---	1-8
A	WO,A,95 16772 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION) 22 June 1995 see page 7, line 21 - page 10, line 6 see page 15, line 19 - line 26 see page 16, line 25 - page 18, line 2 --- -/--	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 1996

Date of mailing of the international search report

17. 12. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati ' Application No
PCT/vE 96/01253

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 12, December 1992, pages 7452-7460, XP000610879 SHIN-TAI CHEN ET AL.: "Repression of liver-specific Hepatitis B virus enhancer 2 activity by Adenovirus E1A proteins" see abstract</p> <p>-----</p>	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01253

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-C-4339922	06-10-94	CA-A- 2170882 WO-A- 9506745 EP-A- 0716711	09-03-95 09-03-95 19-06-96
WO-A-9410322	11-05-94	AU-A- 5457294	24-05-94
WO-A-9516772	22-06-95	NONE	

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01253

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/86 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE,C,43 39 922 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 6.Oktober 1994 siehe Spalte 1, Zeile 43 - Spalte 2, Zeile 3 ---	1-8
A	WO,A,94 10322 (UNIV TEXAS ;HERZ JOACHIM (US); GERARD ROBERT D (US)) 11.Mai 1994 siehe Seite 5, Zeile 34 - Seite 7, Zeile 28; Beispiel 1 ---	1-8
A	WO,A,95 16772 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION) 22.Juni 1995 siehe Seite 7, Zeile 21 - Seite 10, Zeile 6 siehe Seite 15, Zeile 19 - Zeile 26 siehe Seite 16, Zeile 25 - Seite 18, Zeile 2 --- -/--	1-8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2.Dezember 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17.12.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Montero Lopez, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 66, Nr. 12, Dezember 1992, Seiten 7452-7460, XP000610879 SHIN-TAI CHEN ET AL.: "Repression of liver-specific Hepatitis B virus enhancer 2 activity by Adenovirus E1A proteins" siehe Zusammenfassung -----	1

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01253

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-C-4339922	06-10-94	CA-A- 2170882 WO-A- 9506745 EP-A- 0716711	09-03-95 09-03-95 19-06-96
-----	-----	-----	-----
WO-A-9410322	11-05-94	AU-A- 5457294	24-05-94
-----	-----	-----	-----
WO-A-9516772	22-06-95	KEINE	
-----	-----	-----	-----

